

**MÁJSPECIFIKUS TRANSZPORTEREK  
KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA HUMÁN  
EMBRIONÁLIS ÖSSEJTEKBŐL DIFFERENCIÁLTATOTT  
MÁJSEJT-SZERŰ SEJTEKBEN**

Doktori értekezés tézisei

**Török György**

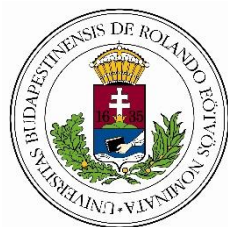
Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,  
Biológia Doktori Iskola, Molekuláris sejt– és neurobiológia oktatási program

Doktori iskola vezetője: Prof. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Juhász Gábor

Témavezető: Dr. Homolya László, az MTA doktora - tudományos tanácsadó

Kutatóhely: Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet



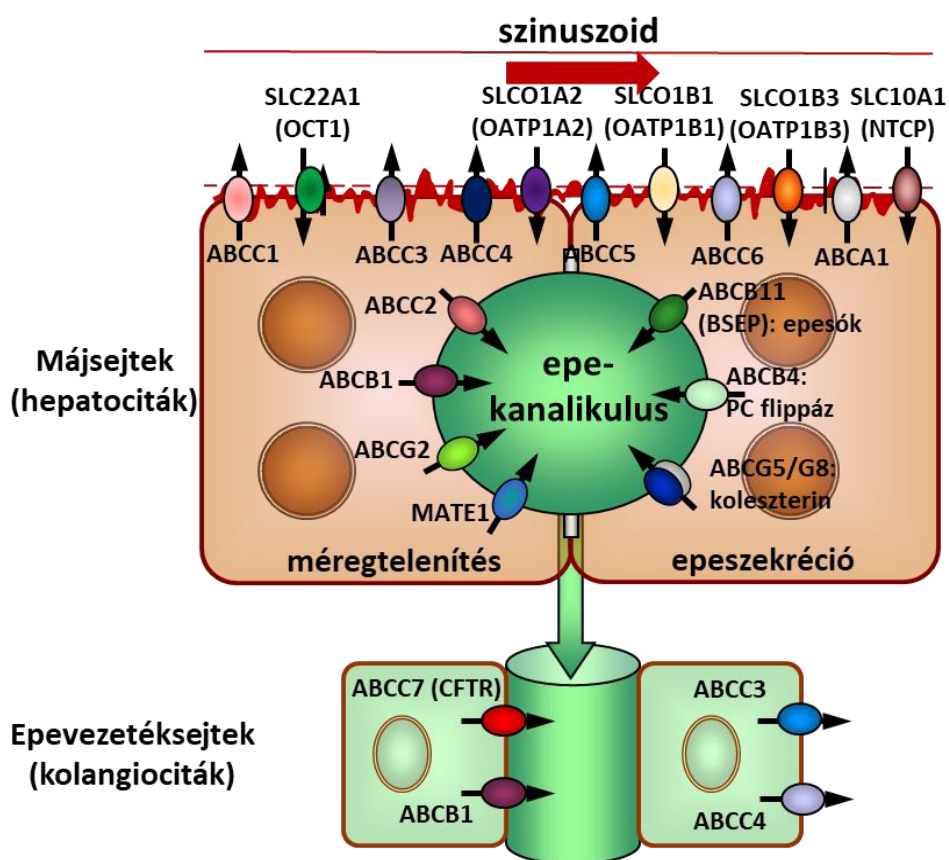
Budapest

2020

---

## BEVEZETÉS

A máj a szervezetben ellátott funkciói alapján az egyik legkomplexebb szervnek tekinthető. A szervezet legfőbb anyagcsereközpontjaként egyszerre lát el fontos feladatokat a szénhidrát-, a fehérje- és a lipidanyagcsere szabályozásában. A máj számos véralvadási faktor és vérfehérje szintéziséért felelős, de az epe-, vitamin- és hormontermelés is a funkciói között szerepel. Az egyik legfontosabb fiziológiás szerepe a méregtelenítés, amelynek során a szervezetbe kerülő endo-, és xenobiotikumok eliminálásra kerülnek. A májszövetben található sejttípusok közül a májsejtek (~70-85%) alkotják a legnagyobb csoportot, és a legtöbb májfunkció ellátásáért is ezek a sejtek felelnek. A májsejtekre jellemző, hogy polarizált felépítésű a membránjuk, azaz a vérrel érintkező bazolaterális (szinuszoidális), és az epecsatornácskák falát alkotó apikális (kanalikuláris) membránjuk különböző tulajdonságokkal rendelkezik. A poláris felépítésnek nélkülözhetetlen szerepe van a méregtelenítő, valamint az epekiválasztó funkciók ellátásában. Ezen funkciók, valamint a koleszterin anyagcserefeladatok ellátásában a membrántranszporterek kiemelt szerepet töltenek be (1. ábra).



*1. ábra A májsejtek és az epevezetéksejtek funkcióinak ellátásában fontos szerepet játszó membránfehérjék és azok jellemző elhelyezkedése. A piros nyíl a vér, a fekete nyilak a transzport folyamatok irányát jelölik.*

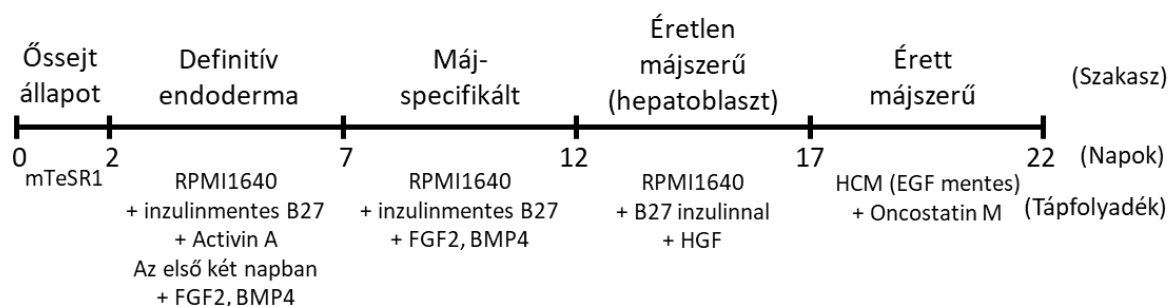
A májbetegségek világszerte a vezető halálozási okok között szerepelnek és a gyógyításuk gyakran csak szervátültetéssel lehetséges. Emellett a farmakológiai és toxikológiai vizsgálatokban is nagy igény szükség van a májsejtekre, melyek hozzáférhetősége erősen korlátozott. A legtöbb alap-, illetve farmakológiai kutatásban ezért sejtalapú tesztrendszerek döntő többsége rákos eredetű sejtvonalakra, vagy állati primer sejt kultúrákra épül. Ezek alkalmazhatósága általában pont az eredetük miatt erősen korlátozott. A humán pluripotens őssejtek májirányú differenciálása megoldást jelenthet ezekre a problémákra, mivel belőlük elvileg korlátlanul előállítható bármilyen sejt- vagy szövettípus, így májsejtek is. Az utóbbi évtizedekben számos májirányú őssejt-differenciációs eljárás vált elérhetővé, ugyanakkor a differenciálódott sejtek jellemzése során kevés figyelem irányult a sejtek membrán-transzportereire, amelyek azonban a sejtek farmakológiai vizsgálatokban való alkalmazhatóságát nagymértékben meghatározzák.

## CÉLKITŰZÉSEK

- Munkánk egyik célja volt, hogy az irodalomban fellelhető leghatékonyabban működő májirányú differenciációs eljárások közül kiválasztott protokollt hozzáigazítsuk az általunk használt HUES9 humán embrionális őssejtvonalhoz. Az így kialakított módszer alkalmazhatóságát meg kívántuk vizsgálni Sleeping Beauty transzpozonos rendszerrel genetikailag módosított HUES9 őssejteken is.
- Célul tűztük ki a differenciációs folyamat során keletkező sejtek részletes jellemzését az irodalomban leggyakrabban alkalmazott morfológiai, génkifejeződési, valamint funkcionális tulajdonságok alapján. Továbbá kiemelten kívántuk vizsgálni a számos májfunkcióban kulcsfontosságú szereppel bíró transzporterek kifejeződését, valamint több májmarker fehérjeszintű kifejeződését és lokalizációját
- További célunk volt a sejt polarizációt elősegítő (szendvics) tenyésztési körülmények; valamint egy epesav szelekciós hatásának vizsgálata a differenciálódott sejtek génkifejeződésre ésérésére.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A vizsgálataink során HUES9, valamint Sleeping Beauty transzpozonos rendszerrel létrehozott genetikailag módosított különböző GFP-vel címkézett ABCG2 variánsokat kifejező HUES9 humán embrionális őssejtvonalakat differenciáltattunk májirányba. Az alkalmazott protokoll sémáját a 2. ábra mutatja be.



**2. ábra** A differenciációs folyamat vázlata az egyes szakaszok időtartamának és az alkalmazott tápfolyadékok összetételének feltüntetésével

A differenciációs folyamat minden szakaszának végén fáziskontraszt mikroszkópiával követtük a sejtek morfológiai változásait. Fluoreszcens mikroszkópiával egy timidin analóg DNS-be történő felhalmozódását vizsgálva meghatároztuk az osztódó sejtek arányát a differenciációs folyamat utolsó 24 órájában. Az egyes szakaszok végén a tenyésztőmédiumból elemeztük a sejtek által termelt albumin és urea mennyiségeket, amelyeket összehasonlítottuk a széles körben alkalmazott modellsejtek vonatkozó értékeivel. Az összehasonlításhoz használtunk alacsony és magas passzázsszámú HepG2, valamint terminálisan differenciáltatott HepaRG sejteket is. A differenciáció egyes szakaszaiban immunfluoreszcens jelöléssel megvizsgáltuk több májsejt és epevezetéksejt markerfehérje kifejeződését és lokalizációját konfokális mikroszkópia alkalmazásával. Kipróbáltuk a szendvics tenyészetek hatását a differenciálódott sejtek érésének elősegítésére. Ehhez a 12. napon egy fedőréteget raktunk a sejtekre, amelyek így tíz napig két fedőréteg között differenciálódtak tovább. A szendvics tenyészetek esetében immunfluoreszcens jelöléssel és konfokális mikroszkópiával megvizsgáltuk több apikális és bazolaterális membránfehérje lokalizációját, valamint az ABCC2 fehérje működéséhez köthető 5(6)-karboxi-2',7'-diklorofluorescein diacetát (CDCFDA) kipumpálását is. Összehasonlításaként egyrétegű kultúrában differenciáltatott sejteket, valamint szendvics kultúrában fenntartott HepG2 és HepaRG sejteket használtunk. A taurourszodeoxikolsav (TUDCA) epesav hatását is megvizsgáltuk a sejtekre, amelyet a differenciáció utolsó két napjában alkalmaztunk a tápfolyadékban. A májirányú differenciáció során, az egyes

szakaszok végén RNS-t izoláltunk a sejtekből, és részletes qPCR-alapú génexpressziós vizsgálatot végeztünk egy általunk tervezett TaqMan Low-Density Array (TLDA) kártyán. Ezen a kártyán a májirányú differenciációra jellemző génekre specifikus, valamint a legtöbb ABC fehérjére és még számos membrántranszporter fehérjére specifikus próbákat alkalmaztunk. Összehasonlításként megvizsgáltuk a korábban már említett modellsejtek mellett az embrionális és felnőtt májból származó mintákat is. A kapott génexpressziós adatokból normalizálás (dCt) után főkomponens analízist (PCA), valamint klaszteranalízist végeztünk.

## TÉZISEK

- Az irodalomból ismert differenciációs protokollokon több módosítást végeztünk. Az így kialakított új eljárással, három biológiai párhuzamoson végeztünk májirányú differenciációt. A vizsgált májspecifikus gének kifejeződése mindhárom mintában, hasonló szinten, és jelentősen megemelkedett. A GFP-vel címkézett különböző ABCG2 variánsokat stabilan kifejező, genetikailag módosított HUES9 őssejtvonalak differenciációjának vizsgálata során megállapítottuk, hogy ezen sejtvonalak májirányú differenciálhatósága jelentősen nem változott meg. Ezek az eredmények megmutatják, hogy az általunk használt eljárással hatékonyan és reprodukálhatóan tudunk májirányú őssejt-differenciációt végezni.
- A morfológiai és sejtosztódási vizsgálatok során a májsejtekre jellemző többsejtmagvú sejteket azonosítottunk, valamint kevés osztódó sejtet találtunk a differenciált kultúrában. Ezek együttesen azt jelzik, hogy a differenciációs folyamat végén a sejtek a májsejtekre jellemző állapotban vannak.
- A differenciációs folyamat során megemelkedett urea és albumin szinteket mértünk a sejtek felülszójából, és azok szintjei összhangban vannak az irodalomban található megfigyelésekkel, teljesítve a májirányú differenciáció sikerességére vonatkozó széles körben elfogadott kritériumokat.
- A HepG2 sejtek esetében a rövid ideig tenyésztett sejtek felülszójából még detektáltunk albumint, a hosszú ideig fenntartott sejtek esetében azonban nem. Az urea termelés esetében nem találtunk ilyen jellegű változást. Ebből arra lehet következtetni, hogy a tenyésztés hatására bizonyos májsejtekre jellemző tulajdonságokat szelektíven elveszíthetnek a HepG2 sejtek.

- A különböző májsejt és epevezetéksejt markerek immunfluoreszcens módszerrel történő vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a differenciáció utolsó szakaszában a sejtek jelentős részére jellemző volt, hogy egyszerre fejeztek ki mindkét sejt típusra jellemző fehérjéket. Az embrionális májsejtmarker, az AFP kifejeződése is jellemző volt még ebben a stádiumban. Ezek együttesen azt jelenthetik, hogy a májsejtek érése nem teljesen fejeződik be, és egyfajta bipotens progenitor stádiumban lehet a sejtek többsége, amelyekből máj- és epevezetéksejtek még egyaránt keletkezhetnek.
- A részletes génexpressziós vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált májsejtekre jellemző gének kifejeződése legtöbb esetben megnőtt. A kontroll mintákhoz hasonlítva megállapítható, hogy az érett májsejtekre jellemző szintek általában elmaradnak a szöveti mintákban tapasztalható értékektől, viszont a modell sejtekhez viszonyítva hasonló, vagy azokat meghaladó értékeket mértünk.
- Ezen vizsgálatokból az is kiderült, hogy a HepG2 sejtek génexpressziós profilja drasztikusan megváltozik és a májsejtekre jellemző gének zömének kifejeződése lecsökken.
- A génexpressziós értékek alapján végzett főkomponens analízis eredményeiből megállapíthatjuk, hogy a differenciáció során a sejtek egyre közelebb kerülnek a szöveti mintákhoz a génexpressziós profiljuk alapján.
- A részletes génexpressziós vizsgálatok eredményeiből az is látszik, hogy az alkalmazott TUDCA kezelésnek és szendvics tenyésztésnek önmagában elenyésző hatása volt a vizsgált gének kifejeződésére.
- Apikális és bazolaterális elhelyezkedésű membránfehérjék, valamint tight junction fehérjék lokalizációjának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a szendvics tenyésztési elrendezésnek kulcsszerepe van a májsejtszerű sejtek polarizációjának elősegítésében. Ebből kifolyólag pozitív hatással van a transzporterek megfelelő lokalizációjára, és az érett májsejtekre jellemző fenotípus alakult ki.
- A CDCDF kipumpálásának vizsgálata során, amelyből az ABCC2 transzporterfehérje funkciójára lehet következtetni, megállapítottuk, hogy a szendvics tenyészetek esetében a festék kanalikuluszerű struktúrákban halmozódik fel, szemben az egyrétegű kultúrák esetében tapasztalható sejten belüli, illetve a kontrollént használt modellsejtek esetében tapasztalt szemi-kanalikuláris felhalmozódással.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján elmondható, hogy sikeresen differenciáltattunk májirányba HUES9 humán embrionális őssejteket, valamint azoknak genetikailag módosított változatát az e sejtvonalakhoz hozzáigazított differenciációs protokollal. Igazoltuk, hogy a keletkezett sejtek mindenben megfelelnek a széles körben alkalmazott májsejtszerű sejtekre vonatkozó alapkövetelményeknek. Az általunk tervezett qPCR-alapú vizsgálati módszer segítségével kimutattuk, hogy az őssejt-eredetű májsejtszerű sejtek kifejezik a májra jellemző markerek és transzporterek legtöbbjét, gyakran magasabb szinten, mint az általánosan használt máj modellsejtek, ugyanakkor az embrionális és felnőtt májmintákra jellemző értékektől elmaradnak. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a HepG2 máj modellsejt expressziós profilja a tenyésztés során drasztikusan átalakul, és elveszti a májsejtekre jellemző karkaterjegyeket, feltehetően a rákos eredet miatti instabil genetikai háttérének következtében. Több fontos marker fehérje kifejeződését és sejten belüli elhelyezkedését is megvizsgáltuk. Több eredményünk arra mutat, hogy a keletkezett sejtek többsége egyszerre rendelkezik epevezetéksejt és májsejt karakterrel, utalva arra, hogy a sejtek érése nem teljesen fejeződik be. Munkánk során megvizsgáltuk a sejt polaritást elősegítő szendvics tenyésztési körülmények és az epesóval kiváltott szelekciós nyomás hatását a keletkezett sejtekérésére. Eredményeink azt mutatják, hogy a kezeléseknek elenyésző hatása van a génkifejeződésre, ugyanakkor a szendvics tenyészetek nagymértékben elősegítik a megfelelő sejt polarizáció kialakulását, valamint a májtranszporterek megfelelő lokalizációját és funkcióját. A qPCR és a mikroszkópos vizsgálatok eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az őssejt-differenciációk során keletkező heterogén sejtpopulációban nem elégséges csak génkifejeződési, vagy fehérjeszint változásokat vizsgálni, fontos követni a lokalizációban és a funkcióban történő változásokat is. Az eredményeink rávilágítanak arra, hogy az irodalomban alkalmazott kritériumok nem elégségesek egy megbízható őssejt-eredetű májmodell megítéléséhez, és nagyobb hangsúlyt kellene fektetni a toxikológiai és farmakológiai szempontból fontos transzporterek kifejeződésére, funkciójára, valamint megfelelő lokalizációjára.

## Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

- Török, G.**, Erdei, Z., Lilienberg, J., Apáti, Á., Homolya, L., 2020. The importance of transporters and cell polarization for the evaluation of human stem cell-derived hepatic cells. PLoS One 15, e0227751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227751>
- Erdei, Z., Schamberger, A., **Török, G.**, Szabó, K., Várady, G., Orbán, T.I., Homolya, L., Sarkadi, B., Apáti, Á., 2018. Generation of multidrug resistant human tissues by overexpression of the ABCG2 multidrug transporter in embryonic stem cells. PLoS One 13, e0194925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194925>

## A szerző további közleményei

- Török, G.**, Cserép, G., Telek, A., Arany, D., Váradi, M., Homolya, L., Kellermayer, M., Kele, P., Németh, K., 2020. Large Stokes-shift bioorthogonal probes for STED, 2P-STED and multi-color STED nanoscopy. MAF, accepted article
- Kiss, B., Mudra, D., **Török, G.**, Mártonfalvi, Zs., Csík, G., Herényi, L., Kellermayer, M., 2020. Single-particle virology. Biophysical Reviews, accepted article
- Ricci, M., Horváti, K., Juhász, T., Szegvártó, I., **Török, G.**, Sebák, F., Bodor, A., Homolya, L., Henczkó, J., Pályi, B., Mlinkó, T., Mihály, J., Nizami, B., Yang, Z., Lin, F., Lu, X., Románszki, L., Bóta, A., Varga, Z., Bősze, S., Zsila, F., Beke-Somfai, T., 2020. Anionic food color tartrazine enhances antibacterial efficacy of histatin-derived peptide DHVAR4 by fine-tuning its membrane activity. Q. Rev. Biophys. 53, e5. <https://doi.org/10.1017/S0033583520000013>
- Györfy, B.A., Tóth, V., **Török, G.**, Gulyácssy, P., Kovács, R.Á., Vadász, H., Micsonai, A., Tóth, M.E., Sántha, M., Homolya, L., Drahos, L., Juhász, G., Kékesi, K.A., Kardos, J., 2020. Synaptic mitochondrial dysfunction and septin accumulation are linked to complement-mediated synapse loss in an Alzheimer's disease animal model. Cell. Mol. Life Sci. 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03468-0>
- Zámbó, B., Móznér, O., Bartos, Z., **Török, G.**, Várady, G., Telbisz, Á., Homolya, L., Orbán, T.I., Sarkadi, B., 2019. Cellular expression and function of naturally occurring variants of the human ABCG2 multidrug transporter. Cell. Mol. Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03186-2>
- Valcz, G., Buzás, E.I., Kittel, Á., Krenács, T., Visnovitz, T., Spisák, S., **Török, G.**, Homolya, L., Zsigrai, S., Kiszler, G., Antalffy, G., Pálóczi, K., Szállási, Z., Szabó, V., Sebestyén, A., Solymosi, N., Kalmár, A., Dede, K., Lőrincz, P., Tulassay, Z., Igaz, P., Molnár, B., 2019. *En bloc* release of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells. J. Extracell. Vesicles 8, 1596668. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596668>
- Györfy, B.A., Kun, J., **Török, G.**, Bulyáki, É., Borhegyi, Z., Gulyácssy, P., Kis, V., Szocsics, P., Micsonai, A., Matkó, J., Drahos, L., Juhász, G., Kékesi, K.A., Kardos, J., 2018. Local apoptotic-like mechanisms underlie complement-mediated synaptic pruning. Proc. Natl. Acad. Sci.



- Petrovics, R., Söveges, B., Egyed, A., Knorr, G., Kormos, A., Imre, T., **Török, G.**, Zeke, A., Kocsmár, É., Lotz, G., Kele, P., Németh, K., 2018. A rapid and concise setup for the fast screening of FRET pairs using bioorthogonalized fluorescent dyes. *Org. Biomol. Chem.* 16, 2997–3005. <https://doi.org/10.1039/C8OB00213D>
- Knorr, G., Kozma, E., Schaart, J.M., Németh, K., **Török, G.**, Kele, P., 2018. Bioorthogonally Applicable Fluorogenic Cyanine-Tetrazines for No-Wash Super-Resolution Imaging. *Bioconj. Chem.* 29, acs.bioconjchem.8b00061. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00061>
- Kovács, T., Máthé, D., Fülöp, A., Jemnitz, K., Bátai-Konczos, A., Veres, Z., **Török, G.**, Veres, D.S., Horváth, I., Szigeti, K., Homolya, L., Szijártó, A., 2017. Functional shift with maintained regenerative potential following portal vein ligation. *Sci. Rep.* 7, 18065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18309-7>
- Jemnitz, K., Bátai-Konczos, A., Szabó, M., Ioja, E., Kolacsek, O., Orbán, T.I., **Török, G.**, Homolya, L., Kovács, E., Jablonkai, I., Veres, Z., 2017. A transgenic rat hepatocyte - Kupffer cell co-culture model for evaluation of direct and macrophage-related effect of poly(amidoamine) dendrimers. *Toxicol. Vitr.* 38, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.016>
- Biri-Kovács, B., Kiss, B., Vadászi, H., Gógl, G., Pálffy, G., **Török, G.**, Homolya, L., Bodor, A., Nyitray, L., 2017. Ezrin interacts with S100A4 via both its N- and C-terminal domains. *PLoS One* 12, e0177489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177489>
- Báti-Konczos, A., Veres, Z., Szabó, M., Ioja, E., László, G., **Török, G.**, Homolya, L., Jemnitz, K., 2016. Comparative study of CYP2B1/2 induction and the transport of bilirubin and taurocholate in rat hepatocyte-mono- and hepatocyte-Kupffer cell co-cultures. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 82, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.05.015>
- Erdélyi-Belle, B., **Török, G.**, Apáti, Á., Sarkadi, B., Schaff, Z., Kiss, A., Homolya, L., 2015. Expression of Tight Junction Components in Hepatocyte-Like Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. *Pathol. Oncol. Res.* 21, 1059–70. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9936-5>
- Homonnay, Z.G., **Török, G.**, Makk, J., Brumbauer, A., Major, E., Márialigeti, K., Tóth, E., 2014. Bacterial communities in the collection and chlorinated distribution sections of a drinking water system in Budapest, Hungary. *J. Basic Microbiol.* 54, 729–38. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300960>